Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

DNA 電気泳動キット

カタログ番号
166-0001JEDU

http://explorer.bio-rad.co.jp

BIO-RAD

充実した指導ガイド

開発されてから5年余、Biotechnology Explorerのキット及びカリキュラムは、先生のために先生によって書かれてきました。そして、高校から大学までの幅広い教育現場で数多く使用されてきました。Biotechnology Explorerは扱いが容易で、教室をバイオテクノロジーの興奮のるつぼに巻き込む素晴らしい方法です。それぞれのキットの画期的なプロトコールは段階的に進行し、熟練した先生はもとより経験の浅い先生でも、充分な指導選択ができます。

それぞれのキットは、実験を行う場合でも設問の解答を考える場合でも、生徒ができるだけ多く参加できるように作られています。参加することにより、生徒は科学的プロセス、および系統的かつ論理的な方法で課題を進めることの価値をより深く理解するようになります。こうした過程を経験することにより、科学的な実験手順や系統的、かつ論理的に物事を進めることの重要性を理解することができるでしょう。さらに、このキットの実験を通じて、生徒達が、科学技術を理解する能力をより高めていくことを期待しています。

このBiotechnology Explorerのカリキュラムはとてもユニークで、理科の先生方に非常に驚かれ、また興味を持って頂いています。バイオ・ラッドではこれからもカリキュラムや製品の改良を進めていきます。皆様のお声はその意味でも大変重要です。ぜひご意見をお聞かせください。

インターネットでカタログおよびカリキュラムをご覧いただけます。http://explorer.bio-rad.co.jp にアクセスしてください。

DNA 断片の分析－バイオテクノジーとゲノム科学との結びつき

本キットで紹介している技術は、組換え DNA 分子の作成、DNA フィンガープリント、および法医学的 DNA 解析の基礎として使用されています。

本キットは、遺伝子工学での大変重要な手法や原理を紹介します。特に制限酵素の機能、および DNA を取り扱う研究においての分子生物学的ツールとしての制限酵素の有用性について学習します。また、アガロースゲル電気泳動法を使用することにより、泳動距離を解析し、切断パターンを検討し、そして未知の DNA 断片の大きさを決定します。

現在では数百もの制限酵素が知られており、これら制限酵素は 20 世紀後半から分子生物学実験手法の進歩を担ってきました。このキットでは制限酵素は *Eco* RI、*Pst* I、および *Hind* III について検討します。また、サンプルは、制限酵素で切断したバクテリオファージ・ラムダの DNA です。これら DNA 断片をゲル電気泳動法で分離し、毒性のないゲル染色液（Fast Blast™ DNA 染色液）で染色して眼で確認できるようにします。

探究心を引き出す授業

このカリキュラムのねらいは、実験を通して“考える力”を生徒達から引き出すことにあります。ここで大切なことは、正しい答えや結果を求めるのではなく、どうしてその結果が得られたのか、注意深く観察したりデータを解析することにより、どのくらい本質に迫ることができるか、になります。そしてこのことが、実験して得られた結果に基づく研究へ結びつきます。

このキットのそれぞれの過程において、チューブの中で何が起こっているのかを理解し、得られたデータを分析する度に、生徒達は刺激を受けるでしょう。説明や注釈を生徒達にする代わりに、学生・生徒用テキストにはあらゆる角度から実験に関して考察させるような質問が用意されています。それらに対する答えは教員用テキストに記載されています。

こうした過程を経験することにより、科学的な実験手順や系統的、かつ論理的に物事を進めることの重要性を理解することができるでしょう。さらに、このキットの実験を通じて、生徒達が、科学技術を理解する能力をより高めていくことを期待しています。

目 次

教員用テキスト 1

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 2

バックグラウンド 3

時間割 6

実験開始前の準備 7

＜実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト＞ 7

＜各ステップの詳細な手順＞ 8

クイックガイド 13

学生・生徒用テキスト 15

はじめに － DNA のかけらはどうやってパズルを解くか。 16

◆Lesson1 制限酵素－分子のはさみ 17

＜学習 1 DNA はどうやって断片に分かれるか＞ 17

＜学習 2 制限酵素－分子のはさみ＞ 18

＜学習 2 応用＞ 20

◆Lesson 2 アガロースゲル電気泳動－分子のふるい 22

＜学習 1 どのようにしてそれぞれの DNA 断片を分離するか＞ 22

◆アガロースゲル電気泳動実験 23

＜学習 2 どうやって DNA を見えるようにするか＞ 26

◆ゲルの染色と脱色 26

◆Lesson3 データ解析 28

付録 A 教員用解答ガイド 38

◆Lesson 1 制限酵素について 38

＜質問＞ 38

＜学習 2 応用＞ 39

◆Lesson 2 アガロースゲル電気泳動 40

＜学習 1＞ 40

＜学習 2 どうやって DNA を見えるようにするか＞ 41

＜DNA 断片の解析＞ 43

教員用テキスト

目次

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 2
バックグラウンド 3
時間割 6
実験開始前の準備 7
＜実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト＞ 7
＜各ステップの詳細な手順＞ 8
クイックガイド 13

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧

このキットの構成物と、キット以外に必要になる試薬・器具等の一覧表です。1キット＝8班×4人分の実験に必要な数になっています。準備の時の確認リストとしてお使いください。

キット内容	1クラス分	(√)
Hind III で切断したラムダファージ DNA[0.2μg/μl]、100μl	1バイアル	❑
Pst I で切断したラムダファージ DNA[0.2μg/μl]、100μl	1バイアル	❑
*Eco*R I で切断したラムダファージ DNA[0.2μg/μl]、100μl	1バイアル	❑
未切断ラムダファージ DNA[0.2μg/μl]、100μl	1バイアル	❑
サンプルローディングダイ(5×)、1.0ml	1バイアル	❑
Fast Blast DNA 染色液(500×)、100ml	1バイアル	❑
1.5ml 蓋付きマイクロチューブ	60本	❑
マイクロチューブラック	8	❑
50×TAE(トリス-酢酸-EDTA)バッファー、100ml	1ボトル	❑
アガロース	5 g	❑

必要な器具等ーキットには含まれません		
マイクロピペット(1～20μl)	1～8	❑
ピペットチップ(1～20μl 用)	1～8箱	❑
必要に応じて 20～200μl または 100～1000 μl のマイクロピペット	1～8	❑
必要に応じて 20～200μl または 100～1000 μl のピペットチップ	1箱	❑
アガロースゲル電気泳動装置 ミニサブセル GT(170-4406JA)	8	❑
パワーサプライ パワーパック Basic(164-5050)	2～8	❑
油性マーカー	1～8	❑
定 規	1～8	❑
セロハンテープ	1～8個	❑
ゲル染色トレイ(166-0477、4枚)	8枚	❑
オプション ー タッパー(ゲル染色トレイが使いにくいとき)	8	❑
微量遠心機	1	❑
精製水	およそ6L	❑
500ml、1L～のメスシリンダー		❑
200～300ml、500ml または 1L のフラスコ		❑
使用済みピペットチップ等廃棄用容器	8個	❑
オプション ー ゲルサポートフィルム(50枚)(170-2984)	1箱	❑

バックグラウンド

現在のバイオテクノロジーの基本的手法として組換えDNA分子の作成があります。これは、ある部分からDNAを切り取り、他の DNA につなぎ合わせる手法です。組換え DNA 分子の作成はある生物から機能的に必要な情報をもつ DNA 断片（＝遺伝子）を切り出し、他の生物の DNA につなぎ合わせ、その遺伝子の働きを調べることです。この結果、予想されることは受け取り側の細胞の中で、新しく獲得した遺伝子が機能することです。これを応用すると、例えば、ある植物に害虫や病気への耐性遺伝子を与えることができたり、機能しない遺伝子や変異型遺伝子を持つ植物や動物に機能する遺伝子を与えることも可能となります。

ここで取り扱う DNA は、制限酵素で断片にできる染色体であることを生徒に示唆しても良いでしょう。生徒が扱う DNA 断片中のある特定の断片は、ある特定の遺伝子かもしれません。この仮想遺伝子は、多数の形質の暗号を持っているかもしれません。しかし、この遺伝子を受け取り細胞に入れる前に、まずアガロースゲル電気泳動法で遺伝子の大きさを確認しなければなりません。

＜制限酵素＞

機能を持つ DNA 断片を予測通り正確に切断（制限）し、貼り付ける（連結する）ことにより、バイオテクノロジー研究者は DNA を組換えることができます。これを組換え DNA 技術といいます。組換え DNA 分子作成の第 1 段階は、染色体上に存在する、目的とする特定の遺伝子の位置を確認することです。その後、制限酵素を使用して目標遺伝子を他の残りの染色体から切り出します。これと同じ制限酵素を使用して受け取り側の DNA を切断し、目標遺伝子を含む DNA 断片を受け取り DNA に挿入することもできます。

制限酵素は生体分子であり、ある特定の部位で DNA を切断（制限）します。制限酵素はまずバクテリアで確認され、分離されました。バクテリアは、バクテリオファージ（バクテリアに感染するウイルス）から侵入してきた DNA を切断する天然防御機構として制限酵素を使用しています。制限酵素に遭遇した異種 DNA は全て「消化」され、多くの断片に切り刻まれて無力になります。これらバクテリアの酵素は、最初の生物学的免疫システムを作り上げます。制限酵素の名前は、その酵素が分離されたバクテリアの名前にちなんでつけられます。例えば、

*Eco*R I＝*Eschericia coli*（大腸菌）から最初に分離された制限酵素
Hind III＝*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）から 3 番目に分離された制限酵素
Pst I＝*Providencia stuartii* から分離された制限酵素

既知の数百の制限酵素は、それぞれ DNA の特定のヌクレオチド塩基配列（切断部位）を認識し、その特定部位のみでDNA分子を切断します。多くの制限酵素は、対を形成しない 1 本鎖ヌクレオチド末端（いわゆる接着末端）を残して切断します。一般に、切断部位はパリンドローム（右から読んでも左から読んでも同じ配列）になっています。このパリンドロームは、対をなす DNA 鎖の塩基配列が前向き、後ろ向きに同じ塩基配列になっているということです。

例として、制限酵素とそれぞれの切断部位を示します。

*Eco*R I	G A-A-T-T-C
	C-T-T-A-A G
Hind III	A A-G-C-T-T
	T-T-C-G-A A
Pst I	C-T-G-C-A G
	G A-C-G-T-C

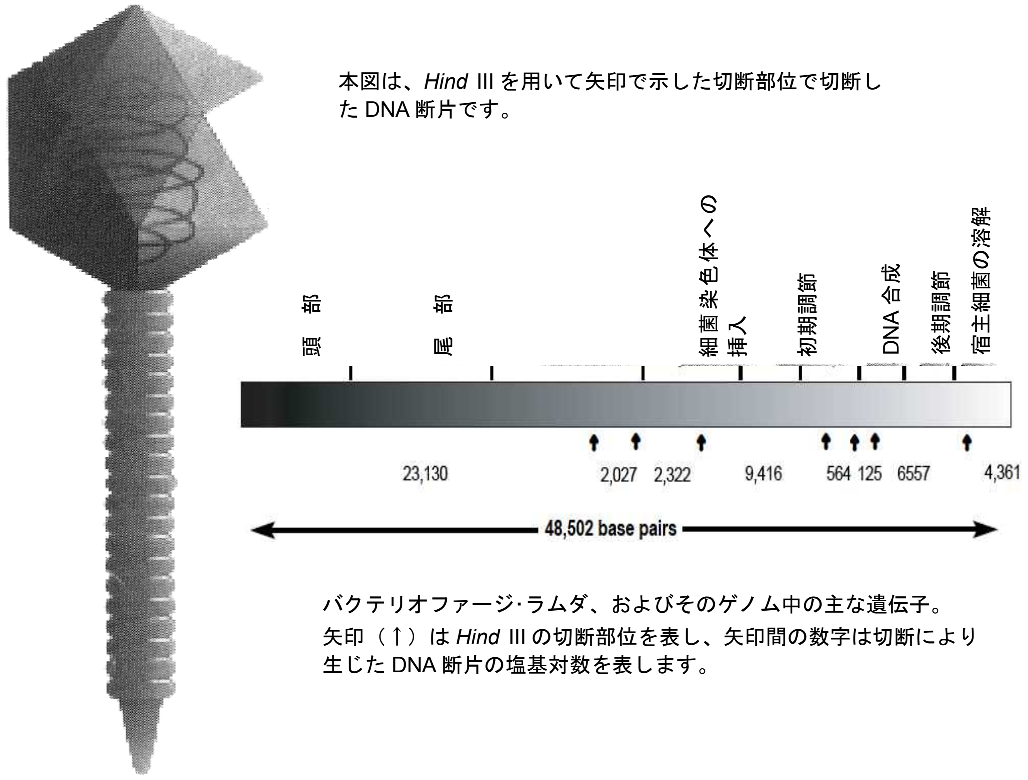
＜ラムダファージ DNA＞

ラムダ DNA は、バクテリアに感染する、バクテリオファージと呼ばれるウイルスに由来します。このウイルスはヒトには無害であり、したがって人間が実験に使用する場合に優秀で安全なDNA源となります。以下は、ラムダ染色体で発見されたいくつかの遺伝子の地図です。

ラムダ DNA の長さは、約 48,000 塩基対（bp；base pairs）です。ラムダはウイルスなので、その遺伝情報の発現および増殖は、ラムダが感染したバクテリア細胞で行われます。本実習では、3 種類の制限酵素がラムダ染色体DNAに与える影響を観察します。

ラムダファージ・ゲノム

本図は、*Hind* III を用いて矢印で示した切断部位で切断した DNA 断片です。



バクテリオファージ・ラムダ、およびそのゲノム中の主な遺伝子。
矢印（↑）は *Hind* III の切断部位を表し、矢印間の数字は切断により生じた DNA 断片の塩基対数を表します。

＜制限酵素切断断片の電気泳動解析＞

制限酵素は、その 3 次元構造あるいは形状により DNA 分子の 2 重鎖間の隙間に密着します。DNA に付着した制限酵素は、特定の塩基配列を認識するまで 2 重らせんに沿ってすべるように移動します。この特定の塩基配列が「信号」となり、酵素の移動が停止します。その後、制限酵素は分子のはさみのように作用して、認識した特定の塩基対配列を切断しながら、その位置（切断部位）で DNA 分子を消化（化学的に切断）します。

DNA 分子上に特定の切断部位が 2 箇所以上ある場合は、制限酵素はそれぞれの切断部位で切断するので、複数の DNA 断片が作られます。例えば、ある制限酵素に認識される特定の切断部位が 5 ヶ所存在する（直線状）DNA では、長さの異なる 6 本の断片ができることになります。各断片の長さは、DNA 分子上に存在する切断部位の位置により異なります。

電気泳動とは電荷を利用して分子を移動させる手法です。アガロースゲル電気泳動法では、DNA 断片はその大きさごとに分かれます。通電性バッファーを満たした泳動槽にアガロースゲルを置き、そのアガロースゲルに DNA 断片を含む溶液を乗せます。泳動槽両端にある針金状電極の間を電流が流れ、電場が発生します。

DNA 分子は負に帯電しており、電場に置かれると陽極方向に引っ張られます。アガロースゲルは分子のふるい（孔状基質）として機能し、小さな DNA 断片ほど容易に移動できます。したがって、DNA 分子がゲルを通って移動した距離と速度は、DNA 断片の大きさ（塩基対の長さ）に反比例します。泳動中は、より小さな断片ほど、より遠くに移動することになります。同じ大きさの断片は一緒に行動し、1 本の DNA バンドとして移動します。これらのバンドは DNA を染色すると肉眼で見えます。

図 1 は 3 種類の制限酵素で切断したラムダ DNA の電気泳動パターンです。いずれも同じラムダ DNA を使用して

います。それぞれの制限酵素（サンプル 1，未切断 DNA；サンプル 2，*Pst* I で切断；サンプル 3，*Eco* RI で切断；サンプル 4，*Hind* III で切断）により、各レーンにそれぞれ独自の切断パターンができていることに注目してください。各バンド中の断片の相対的な大きさは、出発点（ウェル、サンプルを入れる溝）からの移動距離から決定する事ができます。

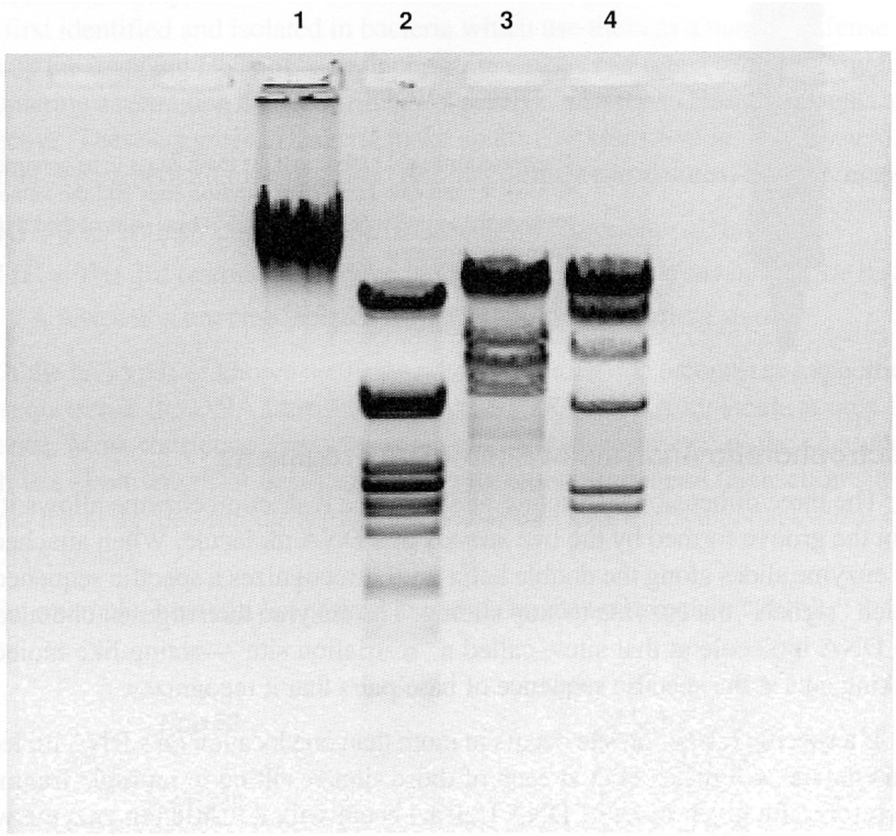


図 1. 3 種類の制限酵素で切断したラムダ DNA の電気泳動パターン

第 1 レーンは未切断ラムダ DNA。第 2 レーンは *Pst* I で切断したラムダ DNA。第 3 レーンは *Eco*R I で切断したラムダ DNA。第 4 レーンは *Hind* III で切断したラムダ DNA。

時間割

このキットを使用するにあたっては、50 分授業を数回行えるようになっています。実験前の講義や準備を含めて、計3 回の授業のカリキュラム例を示します。先生方の都合、生徒のレベル等に合わせてカリキュラムを組んでください。

また、全ての授業に

・生徒のための一連の予備考察

・生徒実験

・解析に関する質問、および結果の解釈

の 3 つの過程が含まれています。

＜スケジュール例＞

第 1 日	ゲルの作成
第 2 日	サンプル添加、泳動、およびゲルの染色
第 3 日	脱色およびデータ解析

＜授業内容＞

Lesson 1; 制限酵素解析への導入

講義、ディスカッション、質問

ゲル作成

Lesson 2; アガロースゲル電気泳動

講義、ディスカッション

電気泳動;染色

Lesson 3; 結果解析

ゲルの脱色

解析に関する質問

標準曲線作成

結果考察

実験開始前の準備

＜実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト＞

◆各生徒に準備する実験試薬・器具

実験を始める前に、実験を行う生徒や生徒達のために、次のリストにあるものをすべて用意します。リストは 1 班当たりに必要なものです。このキットには最高、8 班×4 人＝32 人の生徒が実験できる分量が揃っています。あらかじめ 1 つの班の実験スペースに置いておくと良いでしょう。また、マイクロチューブには、間違いのないようにマーキングをしっかりしておくことをお勧めします。

◆共有で使用する実験試薬・器具

生徒達が共有して使用する試薬や器具を準備します。これらのものは、先生が使用する実験スペースに置くと良いでしょう。ウォーターバスやインキュベーターは前もって温度調節しておく必要があります。

	実験台あたりの数量	(√)
Lesson 1		
・生徒用実験台		
アガロースゲル電気泳動システム（泳動槽、ゲルトレイ、8 ウェルコーム）	1	❑
セロハンテープ	1	❑
油性マーカー	1	❑
・教員用実験台		
1％　アガロース	30～40ml/ゲル	❑
Lesson 2		
・生徒用実験台		
パワーサプライ	1	❑
マイクロピペット、1～20µl	1	❑
マイクロチューブ（1.5ml）	1	❑
マイクロチューブラック	1	❑
油性マーカー	1	❑
Fast BlastDNA 染色液	60ml	❑
ゲル染色トレイまたはタッパー	1	❑
・教員用実験台		
4 種類の DNA サンプル		
未切断ラムダ DNA（L）	1 バイアル	❑
Hind III で切断したラムダ DNA（H）	1 バイアル	❑
*Eco*R I で切断したラムダ DNA（E）	1 バイアル	❑

Pst I で切断したラムダ DNA（P）	1 バイアル	❑
サンプルローディングダイ	1 バイアル	❑
電気泳動用バッファー（1×TAE）	300ml/班	❑

Lesson 3

・生徒用実験台

水	～2.5L	❑
定　規	1	❑
片対数グラフ用紙	1	❑
ゲルサポートフィルム	1 枚	❑

＜各ステップの詳細な手順＞

ここでは実験に先立って行った方が良いと思われる事前準備について説明します。これらの操作は実験の 1～2 日前に先生が行うか、あるいは各生徒グループが授業時間の中で行うとよいでしょう。

Lesson 1

目　的　　生徒用実験台、指導者用実験台の準備。
アガロースゲルの作成。
実験中に生徒がゲルを作成する場合は、先生はアガロースを用意しておくだけで結構です。アガロースを用意する場合は、使用するまで溶かしたアガロースは 55～60 度の恒温水槽に入れておくと良いでしょう。

所要時間　　30 分～1 時間（選択したアガロースゲル調製法による）

必要な材料　　電気泳動泳動槽、ゲルトレイ、コーム、
電気泳動用バッファー（1×TAE）
アガロース粉末

操作手順

・アガロースゲル溶液の調製

1. アガロースの準備：本実験で推奨するゲル濃度は、1％アガロースです。このゲル濃度は解像度に優れ、電気泳動で DNA 断片を分離する場合の泳動時間が最小で済みます。ゲルの厚さは 0.75～1.0 cm です。1％溶液を調製するためには、アガロース 1g を 100ml の 1×TAE バッファーに加えます。アガロース溶解には必ず電気泳動用バッファー（1×TAE）を使用してください。水は絶対に使用しないでください。

2. バッファーの調製： TAE バッファーは 50 倍濃度の保存溶液（50×TAE_）として添付されています。アガロースゲルを作成する他に、電気泳動槽 1 台につき、およそ 275～300ml の 1×TAE バッファーが必要です。1×TAE バッファーが 3L あれば、8 台分の電気泳動槽および 8 枚のアガロースゲル作成に使用できます。50×TAE から 1×TAE を 3L 調製するためには、蒸留水 2.94L に濃縮液 60ml を加えます。下表はゲル作成時に必要な 1 枚分のゲル量の目安としてお使いください。

ゲルの大きさ	0.75cm 厚	1.0cm 厚
7×7cm	30ml	40ml

3. 適当な容器(例えば、250ml の三角フラスコ、スクリューキャップ付き細口ガラスバイアルなど)にアガロース粉末を入れます。沸騰時の事故防止や、アガロースの溶解時間を考慮すると、使用する容器は、一度に調製する液体量の2 倍以上の容量を有する容器、例えば、アガロース 100ml を調製するときは 200～300ml フラスコを使用してください。1×TAE バッファーを適正量加え混ぜ、アガロース粉末をバッファーに懸濁させます。ゲルトレイを形成するために、ホットプレートマグネチックスターラーあるいは電子レンジでアガロースを溶解することができます。アガロース粉末が完全に溶解してしまうまで、この混合液を電子レンジあるいは恒温槽で煮沸します。状況に応じて 2～3 回に分けて調製すると良いでしょう。

警告:アガロースゲルを調製および注入する場合は、常にグローブ、ゴーグル、および実験衣を着用してください。沸騰したアガロース、あるいは熱いアガロース入り容器が皮膚に接触すると、重度のやけどの原因になる恐れがあります。

電子レンジを使用する方法

ゲル溶液を電子レンジに入れます。蓋付ビンを使用している場合は蓋を緩めます。加熱設定を「中」にし、加熱時間を 5 分に設定します。30 秒ごとに、あるいは溶液が沸騰しそうになったら電子レンジを止め、フラスコを実験台上で水平に、ゆっくりと振って溶け残っているアガロースを懸濁させます。これが最も早く、最も安全なアガロース溶解法です。小さな半透明のアガロース粒子が完全に溶解するまで、煮沸と振とうを繰り返します。ゲルトレイに注ぐまで、小さなフラスコで蓋をしたまま 60℃(手で触れらる程度)に冷まします。加熱中は、フラスコ内で突沸が起こらないよう、常に目で見ながら注意してください。

ホットプレートマグネチックスターラー

溶解していないゲル液に攪拌子を入れます。ホットプレートマグネチックスターラーで攪拌しながら沸騰するまで溶液を加熱します。泡はフラスコの頚部をすすぐ前に消えるはずです。小さな半透明のアガロース粒子が完全に溶解するまで煮沸を繰り返します。ゲルトレイに注ぐまで、アルミ箔等で蓋をしたまま 60℃(手で触れらる程度)に冷まします。

・アガロースゲルの流し込み

この実験では、各ゲルに 8 ウェル以上のサンプルウェルが必要です。上記の指示通りにアガロースを調製し、クラスあたりの 1%アガロースの必要量を決定してください。ゲル用コームの歯を完全に覆うまで、およそ 0.5～0.75cm の深さまでアガロースを注ぎます。ゲルトレイのゲルを注ぐ面から 0.75～1.0cm の部分に印をつけておいても良いでしょう。ゲルが固まるまではゲルトレイを動かしたり、さわったりしないでください。 固まったらゲルをジッパー付き保存袋や保存用タッパに入れ、翌日に使用するまで室温あるいは冷蔵庫に保管します。授業で生徒にゲルを作成させる場合、クラス全体がゲルを流し終わるまでの所要時間は約 30 分かかるでしょう。できれば予備のゲルトレイを 1～2 枚作成します。

ここでは、ゲルを流し込む場合にゲルトレイをテープで止める方法を簡単に説明します。その他の方法はサブセル®GT 取扱説明書に詳述されています。

1. ゲルトレイの端をセロハンテープでしっかり目張りします。液体状のゲルがもれないように、ゲルトレイの端にピンと張る状態にテープをとめます。

2. 水平台あるいは実験台上に水準器を置き、水平を確かめたらゲルトレイをおきます。

3. 1×TAE バッファーに溶解したアガロースを、必要な濃度と量で調製します。

4. 流し込む前に 60℃まで冷まします。

5. アガロースを 60℃まで冷ましている間に、ゲルトレイの適当な溝にコームを置きます。(ゲル中央には置かないでください)。

6. ゲル溶液を流し込み、室温に10～20分置いて固まるのを待ちます。使用できるようになると白く濁って（不透明に）見えるようになります。

7. 固まったゲルから慎重にコームを取り外します。真上にそっと持ち上げるようにするとうまくいきます。勢いよく抜いてしまうと、ウェル（溝）部分が陰圧になり、ウェルが壊れてしまうか、穴が空いてしまいます。ウェル部分に空気を少しずつ入れるように抜きます。

8. ゲルトレイ端のテープをはがします。

9. 水平にしたDNA電気泳動槽に、サンプルウェルが陰極側（黒色）になるようにゲルトレイを置きます。泳動中は、DNAサンプルは陽極（赤色）方向に向かって移動します。

Lesson2 アガロースゲル電気泳動、染色

目　的　DNAサンプルローディングダイの分注
FastBlastDNA染色液の調製
生徒用及び指導者用実験台の準備

所要時間　30分

必要なもの　電気泳動用泳動槽、ゲルトレイ、およびゲル用コーム
電気泳動用バッファー（1×TAE）
サンプルローディングダイ
FastBlastDNA染色液

操作手順

・サンプルローディングダイの分注

サンプルローディングダイを分注します。8本の透明なマイクロチューブにサンプルローディングダイを30μlずつ分注します。分注後のマイクロチューブは氷上に置き、1グループに1本ずつ配ります。

・Fast BlastDNA 染色液の調製

染色方法には、一晩染色を行うオーバーナイトステインと染色時間が1～2時間のクイックステインの2種類があります。授業の時間割等に合わせてお選びください。

適当な大きさのフラスコを使用し、

オーバーナイトステインの場合、Fast Blast 染色液1mlを蒸留水499mlで希釈します。

クイックステインで染色する場合は、Fast Blast 染色液100mlを蒸留水400mlで希釈します。

フラスコの口を食品保存用ラップ等で覆い、使用するまで室温で保管します。7cm平方のゲルを染めるのに必要なFast Blast 染色液は60ml～100ml程度（ゲルの厚さにより変わります）になります。

この色素は無毒ですが、手が染まらないようにするために、ゲルを扱う時はラテックス製あるいはビニール製の手袋を使用してください。

・電気泳動槽の準備

アガロースゲルが固まったら、サンプルをゲルにロード（ウェルに加える）して泳動を開始できます。

1. ゲルトレイを泳動槽に置く場合は、サンプルウェルが陰極（黒色電極）側になるように注意します。泳動中は、DNAサンプルは陽極（赤色）方向に向かって移動します。

2. 1×TAE泳動用バッファーを必要量準備します（泳動に使用するバッファーは、必ずゲル作成に使用したバッファーと同じ種類にしてください）。

3. ゲルが 2mm 程度浸るぐらい（およそ 300ml）の 1×TAE 電気泳動用バッファーを注ぎいれます。（ゲルが泳動用バッファーに完全に浸っていることを確認します）

4. ゲルにロードするサンプルを準備します。学生・生徒用テキストのプロトコールを参照してください。

5. マイクロピペットでサンプルをロードします。

注意：サンプルウェルは見にくい場合が多いです。コームを置いた場所、あるいは一般的にサンプルウェルを作る場所の下に黒い紙やテープを置くと、サンプルウェルを見やすくできるでしょう。ピペットの先でウェルを壊さないように注意します。

6. 電気泳動槽に蓋をします。サンプルを乱さないように注意してください。ミニサブセル GT の蓋は、置く方向が決まっています。正しく蓋をするためには、蓋についている赤と黒の差込口を、泳動槽についている赤と黒のプラグに合わせます。

必要な電圧は、ゲルの厚さ、長さ、濃度、泳動用バッファーの濃度や量によって変わります。この実験では、定電圧（100V）での泳動をお勧めします。また、電気泳動がうまくいっているか否かの判断材料の一つになりますので、泳動初期と終了時の電流値を確認し、値をひかえておいてください。DNA サンプルがうまく泳動できなかった等のトラブルがあった際、原因追及の材料になります。

およそ 30 分程度で泳動を停止させますが、諸条件によりこの時間は変わります。

・DNA 断片を見えるようにする － Fast Blast DNA 染色手順

染色方法には、一晩染色を行うオーバーナイトステインと染色時間が1～2時間のクイックステインの2種類があります。授業の時間割等に合わせてお選びください。

＜オーバーナイトステインによる染色方法＞

1. 非金属製のへら等を使用してゲルトレイからゲルを外します。サンプルウェルの列に沿ってゲルが裂ける場合があるので、サンプルウェルの部分を支えるように特別の注意を払う必要があります。

2. ゲルを完全に覆いきるまで 1×Fast Blast DNA 染色液を注ぎます。食品保存用ラップで覆い乾燥を防ぎ、一晩染色します。

3. 翌日、蒸留水でゲルを数回すすぎ、ゲルの背景部分の染色を落とします（脱色）。。

＜クイックステインによる染色方法＞

1. 100 倍希釈の Fast Blast DNA 染色液を用意し、ゲルの入った染色トレイに約 60ml 入れます。染色トレイを食品保存用ラップで覆い、2～3 分置いて染色します。

2. Fast Blast DNA 染色液をバイアルあるいは適切な容器に入れ、およそ 100mlの精製水を注いでゲルをすすぎます。これを 2～3 回繰り返します。

3. 100mlの精製水を容器に注ぎ、1 分間置きます。この時、振盪器などで容器を軽く揺らしてやると、ゲルから余分な染色剤が抜けやすくなります。使用した精製水は廃液用ビーカーに注ぎ捨てます。これを 7～10 回繰り返します。

1～2時間放置します。

Lesson3 結果解析 ― ゲル乾燥

ゲルを乾燥させる前に記録をとっておくとよいでしょう。ゲルが乾燥する前に結果を得るためには、紙または透明なシートにゲルの輪郭、サンプルウェル、および DNA バンドを書き写すか、あるいはカメラで写真を撮影するなどの方法があります。

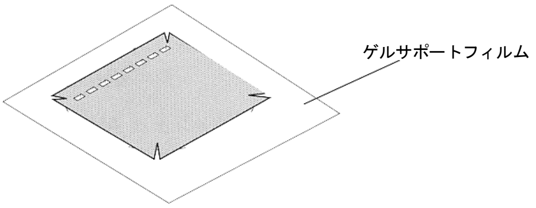
・実験記録を長期保存するためのアガロースゲル乾燥

注意：アガロースゲルを乾燥させるためには、バイオ・ラッド社製高強度分析用アガロースを使用する必要があります。その他のゲルは、乾燥に耐えるようには処方されていません。

脱色したゲルを乾燥させる方法は 2 通りあります。

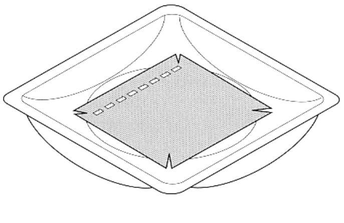
方法 1

この方法をまずお勧めしますが、バイオ・ラッド社製の**ゲルサポートフィルム**（170-2984）を使用する必要があります。脱色したアガロースゲルを染色トレイから取り出します。ゲルサポートフィルムにゲルを直接載せます。ゲルをフィルム中央に置き、完全に乾燥するまで空気乾燥します。ゲルは乾燥するとフィルムに結合し、縮みません。サポートフィルム上に室温で静置しておけば、2～3 日後には完全に乾燥するでしょう。その結果、平坦かつ透明で耐久性のある実験記録ができるでしょう。



方法 2

ゲルを染色、脱色した後、プラスチック染色トレイにゲルを放置します。2～3 日空気乾燥させます。ゲルは乾燥するとかなり縮みますが、比率は変わりません。静かに染色トレイ上に放置すれば、ゲルは比較的平坦なままのはずですが、乾燥するにつれてしわができるでしょう。



・データのグラフ化

ゲルが乾燥する前に結果を得るためには、紙または透明な樹脂板にゲルの輪郭、サンプルウェル、および DNA バンドを書き写すか、あるいはポラロイドのようなカメラで写真を撮影します。

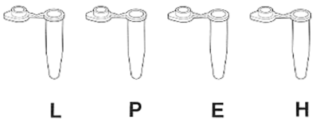
生徒の多くは対数および片対数グラフ用紙に慣れていないかもしれません。スライドあるいはコンピュータを使用して正しい作図法を教える簡単な授業を組んだほうが良いかもしれません。この場合、方眼グラフ用紙でなく片対数グラフ用紙を使用することの利点を説明しても良いでしょう。このように生徒が正規の数学講義以外の場で数学を学ぶよい機会となり得ます。

クイックガイド

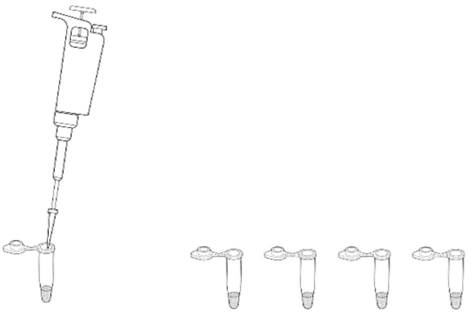
サンプル準備

1. 各色のマイクロチューブを 1 本ずつ取り、以下のように書きます。

   黄色、L＝ラムダ DNA
   紫色、P＝*Pst* I で切断したラムダ DNA
   緑色、E＝*Eco*R I で切断したラムダ DNA
   橙色、H＝*Hind* III で切断したラムダ DNA



2. 原液チューブからマイクロピペットでサンプルを 10μl 取り、対応する色のマイクロチューブに移します。（サンプルごとに新しいチップを使用します。）



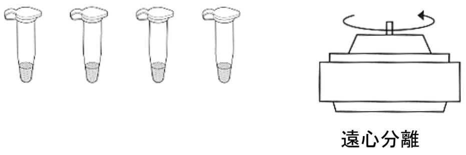
3. ここでは選択肢が 2 つあります。

   選択 1：サンプルを冷蔵庫に保管し、翌日電気泳動を行う。

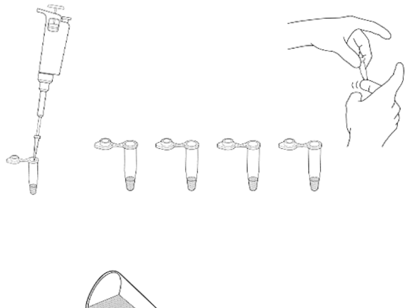
   選択 2：サンプルの準備と電気泳動を同じ日に行う。

アガロースゲル電気泳動

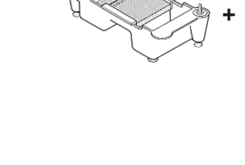
1. DNA サンプルを冷蔵庫から取り出します。マイクロチューブを十数秒遠心して内容液をチューブ底部に集めます。



2. 各チューブにサンプルローディングダイを 2μl ずつ加えます。指ではじくようにして内容を混和させます。チューブ毎に新しいピペットチップを使用します。

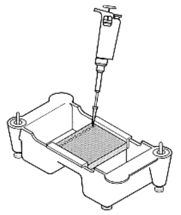


3. ゲルを冷蔵庫から取り出して泳動槽にゲルトレイをセットし、、1×TAE バッファーで泳動槽を満たしゲルを覆います（約 275～300ml のバッファーが必要です）。



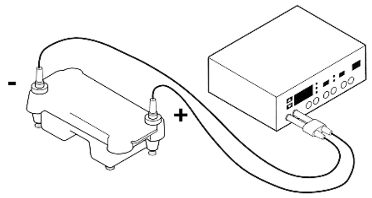
4.　　アガロースゲルのサンプルウェル側を黒色の（－）電極側に置いていることを確認します。

5.　　それぞれのサンプルを、以下の順番でゲルのサンプルウェルに 10μl ずつ別々に入れます。



1 レーン：L、黄色
2 レーン：P、紫色
3 レーン：E、緑色
4 レーン：H、橙色

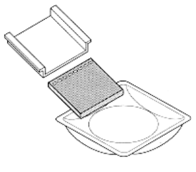
6.　　電気泳動槽に注意深く蓋をします。コードをパワーサプライにつなぎます。赤は赤に、黒は黒につなぎます。



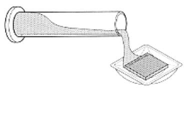
7.　　パワーサプライの電源を入れ、100V で約 30 分間泳動します。泳動初期と終了時の電流値(mA)をひかえておきます。

染色と脱色

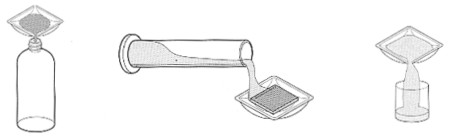
1.　　電気泳動が終わったら、必ずパワーサプライの電源を切りコードを抜いてから、泳動槽蓋をはずします。泳動槽から、慎重にゲルトレイおよびゲルをはずします。注意；ゲルは非常にもろいものです。ゲルを滑らせるようにして染色トレイに移します。



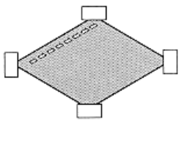
2.　　約 60ml の Fast Blast DNA 染色液をトレイに入れてください。染色トレイを食品保存用ラップで覆います。オーバーナイトステインの場合は 1 晩染色します。（クイックステインの方法は、p.13 を参照ください。）



3.　　DNA 染色液を瓶に注ぎあけます（Fast BlastDNA 染色液は再使用できます）。蒸留水約 60ml をゲルに注ぎます。10～15 分間脱色します。水を廃液用ビーカーに注ぎ捨て、データを解析します。



4.　　ゲルを長期保存する場合、染色トレイ上あるいはゲルサポートフィルム上にゲルを置き、空気乾燥します。ゲルが乾燥したら実験ノートにテープで止めます。



学生・生徒用テキスト

目次

はじめに　－　DNA のかけらはどうやってパズルを解くか。 16

◆Lesson1　制限酵素－分子のはさみ 17

　＜学習 1　DNA はどうやって断片に分かれるか＞ 17

　＜学習 2　制限酵素－分子のはさみ＞ 18

　＜学習 2　応用＞ 20

◆Lesson 2　アガロースゲル電気泳動－分子のふるい 22

　＜学習 1　どのようにしてそれぞれの DNA 断片を分離するか＞ 22

　◆アガロースゲル電気泳動実験 23

　＜学習 2　どうやって DNA を見えるようにするか＞ 26

　◆ゲルの染色と脱色 26

◆Lesson3　データ解析 28

はじめに　－　DNA のかけらはどうやってパズルを解くか。

　現在のバイオテクノロジーの基本的手法として組換え DNA 分子の作成があります。これは、ある DNA から必要な部分を切り取り、他の DNA につなぎ合わせる手法です。これを組換え DNA 分子の作成と言います。例えば、ある生物の DNA から機能的に必要な情報をもつ DNA 断片（＝遺伝子）を切り出し、他の生物の DNA につなぎ合わせ、その遺伝子の働きを調べるとします。この時、受け取り側の細胞の中で、新しく獲得した遺伝子が機能することが予想されます。これを応用するとある植物に害虫や病気への耐性遺伝子を与えることができたり、機能しない遺伝子や変異型遺伝子を持つ植物や動物に機能する遺伝子や正常な遺伝子を与えることがも可能になるかもしれません。

この実験で扱う DNA は、ウイルスの染色体であり、酵素を使って小さなかけら、断片にしてあります。実験では、ゲル電気泳動法という方法で DNA 断片の大きさを決定します。DNA の大きさを決定するためには、分子の混合物を断片の大きさに従って分ける必要があり、その後、実験中の断片の大きさを既知の断片の大きさと比較することになります。

　何種類かの DNA 断片の中にある目的の DNA 断片が1種類存在するとします。今、この目的の DNA 断片が 1 つの遺伝子であり、この遺伝子を用いて組換え DNA 分子を作成しある生物に取り込ませようとしています。しかしその前に、複数の DNA 断片の中から目的の DNA 断片を分離する必要がありますが、このときに、ゲル電気泳動法が用いられます。研究者はゲル中の DNA を見て、目的とする遺伝子をうまく切り出すことができたかどうかを、その遺伝子の大きさで確認することがあります。

このキットを使用した実験の課題は、次の 2 点です。

①様々な大きさの DNA 混合物から大きさごとに分離すること

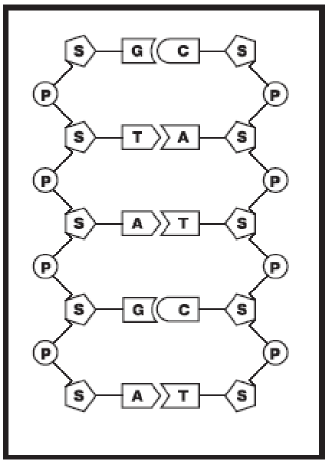
②分離した分子それぞれの大きさを確認すること

実験を始める前に、DNA の構造、および制限酵素の活性について復習しておくと良いでしょう。

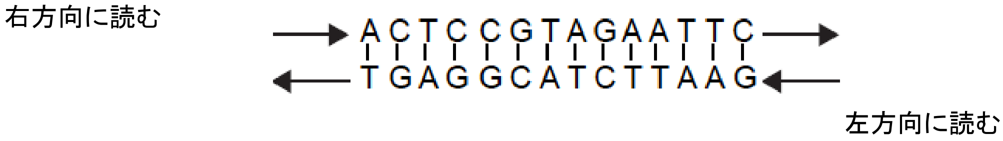
◆Lesson1　制限酵素－分子のはさみ

＜学習１　DNA はどうやって断片に分かれるか＞

DNA は、糖（下図 S）とリン酸（下図 P）の骨格に 4 種類の異なる塩基が結合しており、その塩基が水素結合によって対を作っています。4 種類の異なる塩基は、**アデニン（A）**、**チミン（T）**、**グアニン（G）**、および**シトシン（C）**です。塩基対形成の法則が A と T、ならびに G と C の組み合わせであることを思い出してください。



糖とリン酸を省略して DNA **構造**を図解すると、塩基配列は次のように表わされます。



各鎖の直線状の塩基配列（A、T など）を良く眺めてみましょう。

・上側の塩基配列中に何らかの規則性が見られますか？

・　上側の**塩基**と下側の**塩基**を比較してみましょう。何か関連性があれば述べてください。

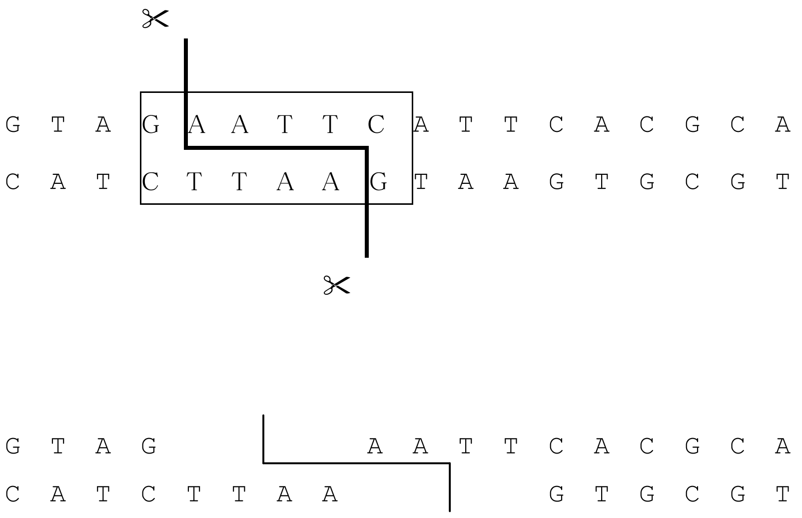
・　次に、上側の塩基**配列**と下側の塩基**配列**を比較してみましょう。塩基配列を右方向に読んだ場合と左方向に読んだ場合に、全く同じ順番で並んでいる塩基配列があることに気づきましたか？気が付いたら、その配列を書き出してみましょう。

塩基配列が無秩序に配列しているように見えることや、2 本の鎖がお互いに相補的であること（A は T と対になる、など）に気づいたかもしれません。また、上鎖の（右方向に読んだ場合の）GAATTC という部分が、（左方向に読んだ場合の）CTTAAG に対応していることにも気づいたかもしれません。同様の対応配列として AAGCTT と TTCGAA、および CTGCAG と GACGTC があります。これらの配列は**パリンドローム**と呼ばれ、DNA 分子には非常に頻繁に出現します。

＜学習 2　制限酵素－分子のはさみ＞

バクテリアの主な敵はバクテリオファージと呼ばれるウイルスです。これらのウイルスは、バクテリア細胞の活動を乗っ取るためにバクテリアの中にウイルス DNA を注入してバクテリアに感染します。バクテリアは、（制限酵素と呼ばれる）天然防御機構を発達させることにより、侵入してきた DNA を切断し破壊することでウイルスに対抗してきました。このような手段は原始的な生物的免疫システムと呼ぶことができるかもしれません。これらの酵素はウイルス DNA を調べて特定のパリンドローム（例えば GAATTC）を探し出し、その部分で DNA を切断します。パリンドローム配列の中で実際に DNA が切断される場所は、**切断部位**と呼ばれます。

次の DNA 配列を見てみましょう。



断片 1　　　　　　　　　　　　断片 2

ある制限酵素は、GAATTC というパリンドローム配列の G と A の間で DNA を切断します。

- 切断部位の左側には何個の塩基対がありますか。

- 切断部位の右側には何個の塩基対がありますか。

- 塩基対数を数えた場合、右側の断片は左側の断片と同じ大きさですか。

- それぞれの断片の大きさは、塩基対数と関連させると、どのように書き表せるでしょうか？

制限酵素について学ぶ場合、重要な点は、それぞれの制限酵素が特定のパリンドロームのみを認識し、特定の塩基配列のみでDNAを切断するということです。パリンドロームは1本のDNA鎖で何度も繰り返すことができ、それがいかなる生物由来のDNAであっても、ある特定の制限酵素は**全ての特定のパリンドロームをその切断部位で切断します**。

・ GAATTCというパリンドロームが4回繰り返しているDNAがあり、その塩基配列を認識する制限酵素がそのDNAを切断するとしたら、何個のDNA断片ができるでしょうか。

・ GAATTCというパリンドロームがDNA鎖に沿ってそれぞれ異なる間隔で繰り返していたら、切断により生じるDNA断片の大きさについてどんなことが言えますか。

下表は、DNA鎖上の数多いパリンドロームの中の3種類と、その配列を認識する特定の制限酵素です。

DNA上のパリンドローム	パリンドロームを認識する制限酵素名
GAATTC **CTTAAG**	*Eco* RI
AAGCTT **TTCGAA**	*Hind* III
CTGCAG **GACGTC**	*Pst* I

＜ここまでのまとめ＞

・ 1本のDNA鎖上の塩基配列は、対をなすDNA鎖にパリンドロームを持っている場合があります(GAATTCとCTTAAGなど)。

・ パリンドロームは制限酵素によって検出されます。

・ 制限酵素はある特定のパリンドロームを認識し、その中の切断部位でDNAを切断します。

・ 1つの制限酵素は特定の1つのパリンドロームのみを認識します。

・ 切断部位でDNAを切断することにより、DNA断片ができます。

・ 断片の大きさは、そのDNA中の切断部位の位置によって決定されます。

＜学習 2　応用＞

1. 下に DNA 分子全体を示しました。この DNA は 1 本の黒い線で示しています（実際には、DNA は 2 本の鎖でできています）。

- DNA 分子上に、特定のパリンドロームに対応する切断部位 A と切断部位 B があるとすれば、このパリンドロームを認識する制限酵素に切断された場合、何個の断片ができますか。

- 各断片に番号を付けましょう。
- 最も大きな断片は何番ですか。

- 最も小さな断片は何番ですか。

2. 特定のパリンドロームに対応する切断部位が、それぞれ異なる間隔で 5 ヶ所に存在する DNA 分子を書いてください。それぞれの切断部位を制限酵素で切断した場合、何個の断片ができますか。

- 各断片に番号を付けましょう。

- 断片を大きい方から順番に並べてみましょう。

3. この図では、A と B は同じ DNA 鎖上の異なるパリンドローム配列です。B 配列を認識する制限酵素だけで切断したとします。

・断片が 2 個しかできない理由を説明してください。

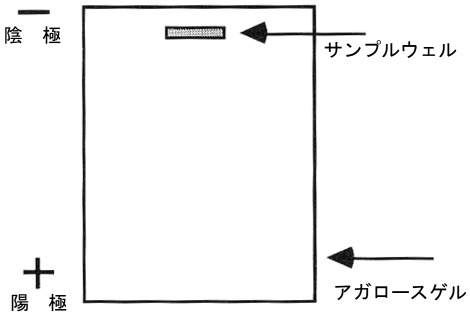
◆Lesson 2 アガロースゲル電気泳動－分子のふるい

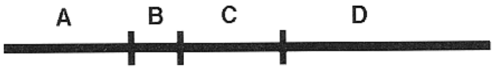
＜学習 1 どのようにしてそれぞれの DNA 断片を分離するか＞

アガロースゲル電気泳動法は、DNA 断片の分離によく利用される方法です。DNA 分子は負に帯電しています。研究者はこの性質を利用して DNA 断片を分離する手法を考え出しました。ゲルに作った小さなサンプルウェル（試料溝）に DNA 断片の混合液を入れます。（これをロードする、といいます）ゲルは寒天やゼリー菓子のようなものです。そこに電気を流すと負に帯電している DNA 分子はゲルの中を、陽極に向かって移動します。

ゲルとはふるいのようなものだと想像してください。そのふるいには小さな穴があいていて、小さな粒子はその穴の中を非常に早く移動できます。大きな分子ほどゆっくりとゲルのふるいにかけられます。通電終了後には、断片は大きさごとに分類されています。同じ大きさの断片は、ゲル中を一緒に移動しようとします。そのような断片のグループは、バンドと呼ばれる濃い帯を形成し、1 つのバンド中の断片は全て同じ大きさです。

あるDNA は、下図のように 4 種類の断片に切断されます。この 4 種類の断片の溶液をアガロースゲルのサンプルウェルに入れます。上で述べた電気泳動の原理をふまえて、右図にそれぞれの断片がどのように分離するか考えて書き入れてみましょう。





ここで、先生の答えと比べてみましょう。

みなさんの予測は正解でしたか？

・より大きなの断片（塩基対数の多い断片）はゲルの上部、下部のどちらにありますか。それはなぜですか。

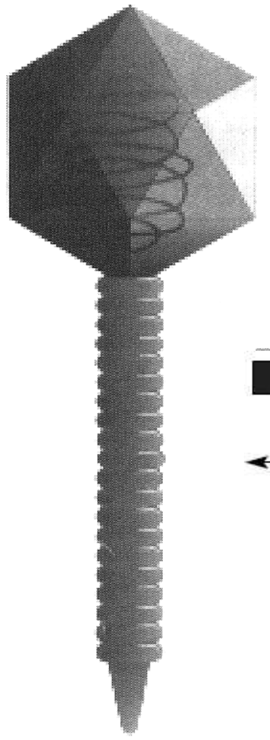
・ 4 種類の断片がそれぞれ 500 個ずつあるとしたら、バンドは何本になるでしょうか？

・ それぞれの断片の重さを量ることができるとしたら、一番重いのはどれでしょう？また、それはなぜですか。

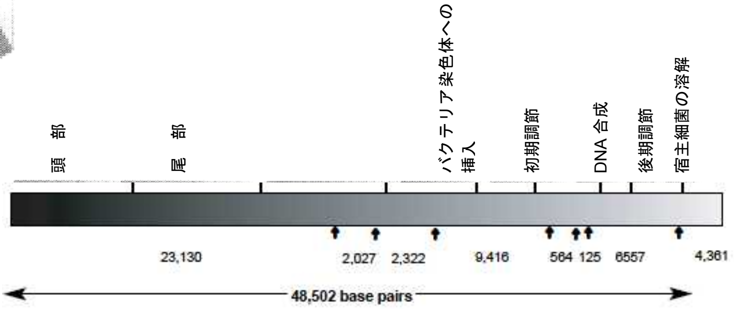
・ DNA 断片がアガロースゲルを通って移動する場合は、この法則に従います。

DNA 断片が大きければ大きいほど、＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿



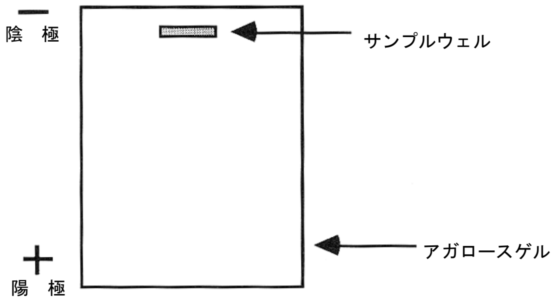
ラムダ DNA を *Hind* III を用いて、切断した DNA 断片図。



バクテリオファージ・ラムダ、およびそのゲノム中の主な遺伝子。
矢印（↑）は *Hind* III の切断部位を表し、矢印間の数字は切断により生じた DNA 断片の塩基対数を表します。

・ 制限酵素 *Hind* III により生じた断片数は何個ですか。

・ これらの断片が電気泳動中にどのように分かれるか、予測して右のゲル図に書き入れてください。また、各断片に塩基対数を書き加えてください。



◆アガロースゲル電気泳動実験

＜サンプル準備＞

1．4 本のマイクロチューブに L、P、E、および H と書き、マイクロチューブラックに立てます。

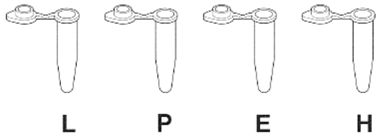
L ＝ 制限酵素なしー完全なラムダ DNA

P ＝ *Pst* I で切断したラムダ DNA

E ＝ *Eco*R I で切断したラムダ DNA

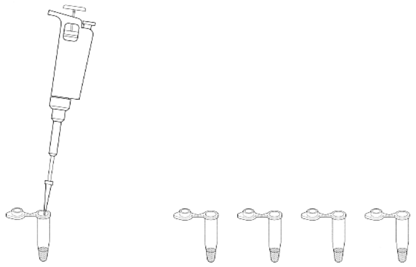
H ＝ *Hind* III で切断したラムダ DNA

（*Hind* III で切断された断片の大きさは既にわかっています。したがって、*Hind* III で切断したラムダ DNA が大きさの基準になります。）



2．マイクロピペットのダイアルを 10μl に合わせて新しいチップを装着し、先生（共用）実験台の氷上にある原液チューブ L に入っているラムダ DNA10μl を、自分達の実験班のマイクロチューブ L に移します。（この時、チップの先をなるべくマイクロチューブの先端のほうまで入れて、吸い取った液を移します。）原液チューブ L は氷上に戻しておいてください。

3．P、E、および H チューブの DNA についても、ステップ 2 と同様の操作を行います。各サンプルとも 10μl ずつにしてください。毎回ピペットチップを取り替え、原液は氷上に戻してください。

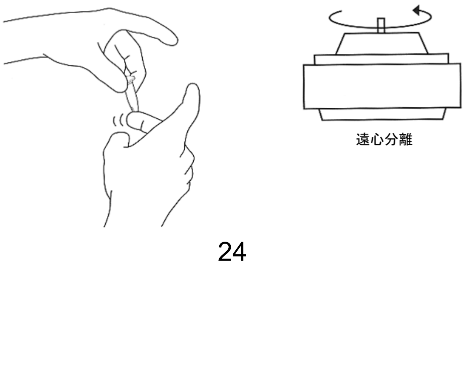


・ この時、チューブに入れた DNA は肉眼で見えますか。

アガロースゲル内を DNA が分離して進んでいく過程を見るためには、これらの目に見えない DNA 断片を見るための可視色素を加えて印をつけ、「追跡」しなければなりません。このためには、サンプルローディングダイと呼ばれる青色色素を加えます。サンプルローディングダイには、実際には 2 種類の色素が入っています。1 つの色素は DNA 断片より速くゲル中を移動し、もう 1 つの色素はどの DNA 断片よりも遅く移動します。

4．マイクロピペットのダイアルを 2.0μl に合わせ、L、P、E、および H と記したマイクロチューブにサンプルローディングダイを 2.0μl ずつ加えます。1 回ごとにチップを取り替えてください。この時もすでにチューブに入っている液の液面近くにチップの先を置くような感じで吸い取った青い液を加えます。

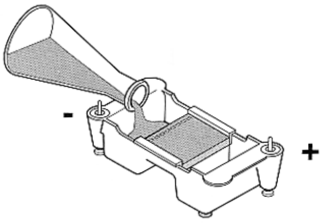
5．ゲルのサンプルウェルにサンプルを入れる前に、各マイクロチューブの DNA とマーカー色素を完全に混和させてください。片方の手の親指と人差し指でマイクロチューブ頭部を持ち、もう一方の手の人差し指でマイクロチューブをはじくようにするとうまく混和できます。マイクロチューブ用遠心分離機を使用している場合は、（DNA とサンプルローディングダイが入っている）4 本のマイクロチューブを遠心分離機に入れます。マイクロチューブを等間隔にバランスをとって並べるよう注意してください。マイクロチューブを回転させる前に先生に確認してもらってください。マイクロチューブを10秒ぐらい回転させます。この操作により、DNA とサンプルローディングダイを混和でき、チューブ壁面についている液をチューブの先にあつめることもできます。



＜電気泳動槽にゲルを準備する＞

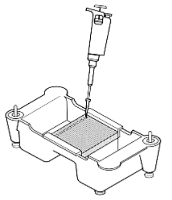
1. 固まったゲルが入ったゲルトレイを、泳動槽の中央の台上に置きます。必ず泳動槽端の黒色の電極に連結している陰極（－）側にサンプルウェルを置くようにしてください。慎重にコームをゲルから外します。真上にそっと持ち上げるようにするとうまくいきます。

2. 電気泳動槽に電気泳動用バッファーを約 275～300ml 注ぎます。ゲルの上をおおよそ 2mm 覆うまでバッファーを注ぎます。

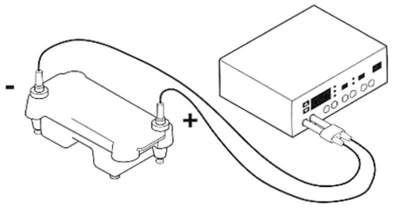


3. ピペットで各マイクロチューブ（L、P、E、および H）からサンプルを 10μl ずつ取り、ゲルの、1つのサンプルウェルに1サンプルずつ入れます。サンプルごとに新しいチップを使用してください。次の順番で並べてください。

レーン	マイクロチューブ
1	L
2	P
3	E
4	H



4. 泳動槽に蓋をします。電気コードをパワーサプライにつなぎます。陽極は陽極に（赤は赤に）、陰極は陰極に（黒は黒に）つなぎます。



5. 100V で約 30 分間電気泳動してください。通電して間もなく、サンプルローディングダイがゲル内を陽極に向かって移動するのが見えます。泳動初期と終了時の電流値（mA）を確認し、その値をひかえておきます。

電気泳動が終了したら、必ずパワーサプライを切ってコードを抜いてから、泳動槽の蓋をはずします。

7. ゲルトレイを泳動槽からはずします。ゲルがトレイから抜け落ちてしまわないように、移動する時はゲルトレイを水平に保ってください。

8. バッファーは元の容器に戻してください。

＜学習 2 どうやって DNA を見えるようにするか＞

・　サンプルローディングダイを加える前の DNA は何色でしたか？

DNA は本来無色であり、ゲル中の DNA を直接見ることはできません。電気泳動に続いて、DNA バンドを見るためにゲルを染色する必要があります。研究者はゲルの DNA を見て、染色体から目的の遺伝子をうまく切り出せたかどうか、またその遺伝子の大きさを確認します。

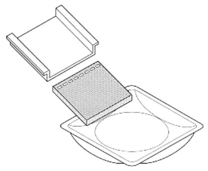
◆ゲルの染色と脱色

ここで、どうしたら DNA を見えるようにできるか、考えてみましょう。

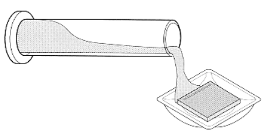
・サンプルローディングダイを加える前の DNA は何色でしたか。

DNA は本来無色であり、ゲル中の DNA を直接見ることはできません。電気泳動に続いて、DNA バンドを見るためにゲルを染色する必要があります。今回使用する色素は直接皮膚についてしまっても無毒なものです。

1. 染色トレイのふちにグループ名を書きます。
2. ゴム手袋をします。
3. ゲルを滑らせるようにして、ゲルトレイの端から染色トレイに慎重に移します。



4.　約 60ml の Fast Blast DNA 染色液をトレイに入れてください。染色トレイを食品保存用ラップで覆います。オーバーナイトステインの場合、1 晩染色します。クイックステインの場合は 2～3 分置いて染色します。



5. ゲルを 1 晩染色します（オーバーナイトステインの場合）。

クイックステインによる染色方法

Fast Blast DNA 染色液には、クイックステインとオーバーナイトステインの2種類の染色方法があります。ここではクイックステインでの染色方法を示します。

1. 100 倍希釈の Fast Blast DNA 染色液を用意し、ゲルの入った染色トレイに約 60ml 入れます。
2. Fast Blast DNA 染色液をバイアルあるいは適切な容器に入れ、およそ 100mlの精製水を注いでゲルをすすぎます。これを 2～3 回繰り返します。
3. 100mlの精製水を容器に注ぎ、1 分間置きます。この時、振盪器などで容器を軽く揺らしてやると、ゲルから余

分な染色剤が抜けやすくなります。使用した精製水は廃液用ビーカーに注ぎ捨てます。これを 7～10 回繰り返します。

4．1～2時間放置します。

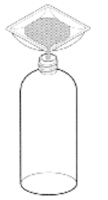
◆Lesson3　データ解析

前回使用した DNA 染色液はアガロースゲルに浸透されたはずです。ここでは、オーバーナイトステインの場合ゲルから余分なDNA 染色液を取り除きます（脱色）。ある程度の染色液がゲルに残ることもありますが、ゲル中の DNA はより濃い青色に染まるでしょう。

次の課題はゲル中の DNA バンドのパターン解析です。

＜ゲルの保存＞

1．染色トレイの DNA 染色液を元の容器に注ぎ戻します。DNA 染色液は 2～3 回程度繰返し使用できます。脱色するために、染色トレイに精製水を入れ、ゲルを軽くすすぎます。ゲルを十分覆う量の水を染色トレイに入れます。10～20 分置いてから余分な水を注ぎ捨てます。各レーンの DNA バンドを観察します。（ゲルを 1 晩水に漬けて置くと、DNA バンドとアガロースゲルのコントラストがより良くなるでしょう。）



2.　白い紙の上にゲルを置いて観察し、結果を記録します。ゲルの上に透明なプラスチックフィルムを置きます。サンプルウェルの位置とバンドパターンを油性マーカーでプラスチックフィルムに写し取ります（ゲルの「コピー」を作ります）。プラスチックフィルムを取りはずして解析します。

ゲルをゲルサポートフィルムに乗せるか、あるいは染色トレイに戻し、室温で空気乾燥します。ゲルは乾燥するとフィルムに貼り付きます。乾燥したゲルをテープで実験ノートに貼り、実験の長期保存記録とします。

DNA 電気泳動バンドパターンのコピーであるプラスチックフィルムを貼りましょう。

電気泳動ゲルのコピー

もしあれば、DNA 電気泳動バンドパターンを示す乾燥ゲルを貼りましょう。

乾燥した電気泳動ゲル

＜データをまとめる＞

データを解析する第１の方法の１つは、制限酵素で切断した各断片の大きさの近似値を決定することです。各 DNA 断片の大きさは、既知の大きさの DNA 断片（標準 DNA）と比較することで決定できます。最も一般的な標準 DNA の１つが、ラムダ DNA を *Hind* III で切断した DNA 断片です。

1．DNA 断片がサンプルウェルから移動した距離を（ミリ単位で）計測します。サンプルウェルの１番下から各 DNA バンドの中央までの距離を測り、次ページの表に書き入れます。

2．各切断断片の大きさ（塩基対の数）を推定します。未知のバンド（ラムダ DNA、*Pst* I 切断断片、および *Eco*R I 切断断片）の移動距離を *Hind* III 切断断片のラダーと比較します。推定値をデータ表に書き入れます。

3．未知の DNA バンドの大きさをさらに正確に推定するためには、まず、既知の DNA　*Hind* III ラダーからの測定値を基準にして標準曲線を作ります。次の解析では標準曲線を作り、各 DNA バンドの大きさをより正確に決定します。

データ表。各断片がサンプルウェルから移動した距離を（ミリ単位で）計測し、表に記録します。
Hind III ラダーの位置と比較して、各断片の大きさ（塩基対の数）を推定します。
中には 6 断片よりも少ないレーンもあります。

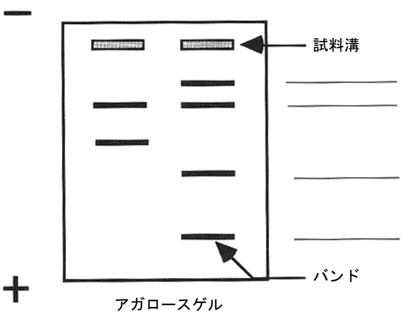
一番大きな断片から書きましょう ↓	L ＝ 制限酵素なしー完全なラムダ DNA		P ＝ ラムダ DNA の *Pst* I 切断断片		E ＝ ラムダ DNA の *Eco*R I 切断断片		H ＝ ラムダ DNA の *Hind* III 切断断片	
	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数
バンド 1								23,130bp
バンド 2								9,416bp
バンド 3								6,557 bp
バンド 4								4,361bp
バンド 5								2,322bp
バンド 6								2,027bp

＜DNA 断片の解析＞

みなさんが作成した図は、既知の大きさの DNA を制限酵素で切断したバンドの相対的な位置を表しています。この種の切断断片は多くの場合 DNA スタンダードと呼ばれます。これら断片の正確な大きさや位置がわかっているので、それらを未知の断片の大きさを推定するための基準として利用することができます。

ここで、アガロースゲルの図を見てください（下図）。2 本の**レーン**があります。レーンはサンプルウェルの下に伸びたバンドの柱です。右側のレーンは長さがわかっている 4 種類の断片（6,000、5,000、3,000 および 1,000 塩基対）を含んでいます。

・ DNA スタンダードはどちらのレーンですか。なぜわかりましたか。



・ 右レーンの各バンドに、それぞれの塩基対の大きさを書き入れてください。

・2 本のレーンのバンドを比較します。左レーンの断片の大きさを推定してください。

上のバンド＿＿

下のバンド＿＿

・ 左レーンの 2 本のバンドの大きさは、どのようにして決定しましたか。

実際に電気泳動したゲルを見てみましょう。

・ 各バンドがサンプルウェルから移動した距離をミリ単位で測りましょう。

サンプルウェルの 1 番下からバンドの下の線までの距離を測ってください。

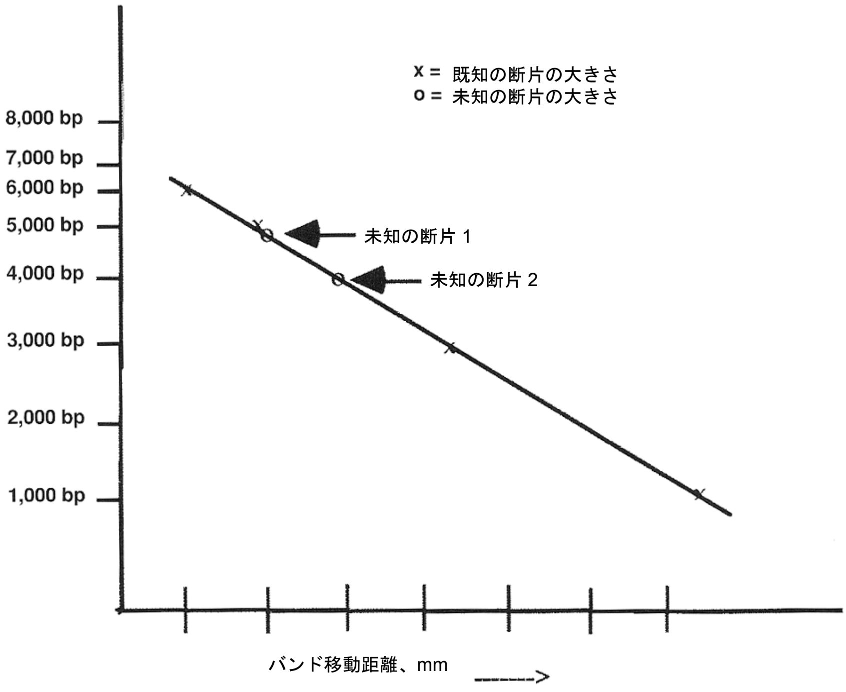
・ データを右の表に書き入れましょう。

・ 数字はミリ単位で書いてください。

左レーン		右レーン	
1		1	
2		2	
		3	
		4	

ゲル上の各断片の塩基対（base pair = bp）数を決定できる方法はもう1つあり、こちらの方法の方がより正確に大きさを決定できる場合もあります。この方法では、既知の断片（*Hind* **III 切断断片**）の大きさと各バンド（断片）がゲル内を移動した距離の関係をグラフ化する必要があります。この方法により、ゲル内の移動距離と断片の大きさの関係がより正確になるでしょう。この方法には片対数グラフが最適です。

実験に使用したゲルからのデータを見てください。既知の断片の大きさを下図に書き入れてあります。



未知の断片の移動距離もグラフに書き入れています。未知の断片の点から塩基対数（bp）を表す縦軸に直線を引くことで、断片の大きさを決定できます。

- 断片 2 の塩基対数は何個ですか。

- この推定法はどの程度正確ですか。

＜ゲル電気泳動で得た実験データから DNA 断片の大きさを決定する＞

実験データから、ゲルで分離した各 DNA 断片の大きさの近似値を推定できます。この結果は塩基対数で表されます。

・この決定法のやりかたを説明してください。

片対数グラフが後に示してあります。以下の段階通りに進めると作図しやすいでしょう。

1. 断片の大きさを縦（Y）軸にとります。

2. サンプル中の塩基対数は 2,000～48,000 塩基対の範囲内なので、およその目盛は以下のようになります。

第 1 サイクル　100～1,000 塩基対

第 2 サイクル　1,000～10,000 塩基対

第 3 サイクル　10,000～100,000 塩基対

縦軸を書いたら、次に進む前に先生に確認してもらってください。

3. 横（X）軸はゲル内を移動した距離をミリ単位で表さなければなりません。

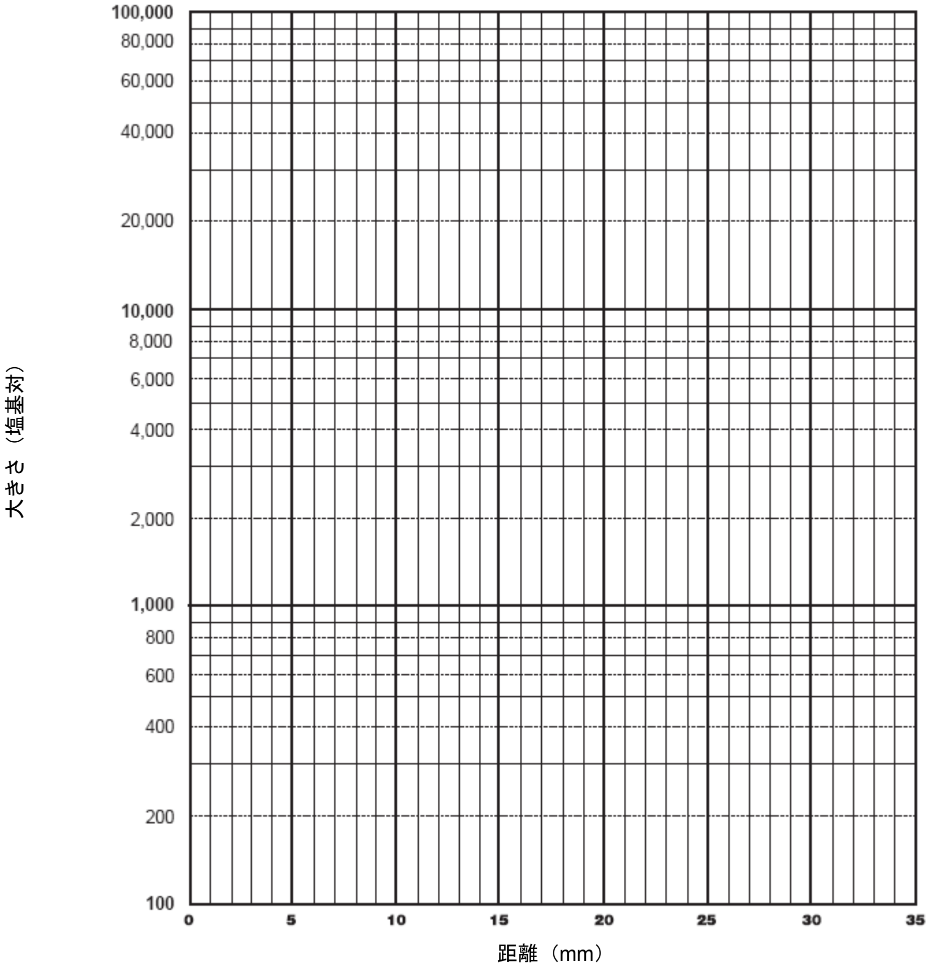
4. 既知の断片（*Hind* III 切断断片）の大きさを基にして、移動距離と断片の大きさの関係を図に書き入れます。それらの点をできるだけ多くつなげるような直線を引きます。これが「標準曲線」になり、これを基準に他の 2 つのサンプル中に含まれる未知の断片の大きさを決定します。

＜未知の断片の大きさを決定する＞

1. 各断片の「移動距離」を X 軸上に取り、その点から標準曲線に向かって垂直に直線を引きます。

2. この直線と標準曲線との交点から、断片の大きさを表す Y 軸に向かって水平に直線を引きます。この直線と Y 軸との交点が断片の大きさを示すことになります。

片対数グラフ


100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
1,000
800
600
400
200
100
0
5
10
15
20
25
30
35
距離（mm）
大きさ（塩基対）

・ 片対数グラフで決定した「未知」断片の大きさを記入し、表を完成させてください。最初のゲル解析のバンド位置を比較して得た値を、この同じ表に示すと興味深いかもしれません。2 組の値を比較しましょう。

一番大きな断片から書いてください ↓	L ＝ 制限酵素なし－完全なラムダ DNA		P ＝ ラムダ DNA の *Pst* I 切断断片		E ＝ ラムダ DNA の *EcoR* I 切断断片		H ＝ ラムダ DNA の *Hind* III 切断断片	
	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数
バンド 1								23,130bp
バンド 2								9,416bp
バンド 3								6,557 bp
バンド 4								4,361bp
バンド 5								2,322bp
バンド 6								2,027bp

- このデータ表の完成後に、本実験で DNA 断片の大きさを決定するために行ったことを簡単に説明してください。

- さらに正確に DNA の大きさを推定する方法を考え、説明してください。

- 断片の大きさ（塩基対数）を決定する 2 種類の方法（直接ゲル計測および片対数グラフ）を比較しなさい。どちらの方法がより正確だと思いますか。

  理由を説明してください。

付録 A　教員用解答ガイド

◆Lesson 1　制限酵素について

＜質問＞

各鎖の塩基配列（A、T、など）を良くながめてみましょう。

・上側の塩基配列中に何らかの規則性がみられますか？

上側の塩基配列には特定の規則性は見られません。

・上側の塩基と下側の塩基を比較しなさい。関連を認めたら説明しなさい。

A は常に T と対になり、G は常に C と対になります。

・次に、上側の塩基配列と下側の塩基配列を比較してみましょう。塩基配列を右方向に読んだ場合と左方向に読んだ場合に、全く同じ順番で並んでいる塩基配列があることに気づきましたか？気が付いたら、その配列を書き出してみましょう。

CTTAAG

ある制限酵素は、GAATTC というパリンドローム配列の G と A の間で DNA を切断します。

・切断部位の左側には何個の塩基対がありますか。

4 個

・切断部位の右側には何個の塩基対がありますか。

10 個

・塩基対数を数えた場合、右側の断片は左側の断片と同じ大きさですか。

いいえ、右側のほうが大きいです。

・それぞれの断片の大きさは、塩基対数と関連させると、どのように書き表すことができるでしょうか？

断片 1 は 4 塩基対です。

断片 2 は 10 塩基対です。

・GAATTC というパリンドロームが 4 回繰り返している DNA があり、その塩基配列を認識する制限酵素がその DNA を切断するとしたら、何個の DNA 断片ができるでしょうか。

5 個

・GAATTC というパリンドロームが DNA 鎖に沿ってそれぞれ異なる間隔で繰り返していたら、切断により生じる DNA 断片の大きさについてどんなことがいえますか。

それぞれ異なる大きさの断片ができるでしょう。

＜学習 2 応用＞

・ DNA 分子上に、特定のパリンドロームに対応する切断部位 A と切断部位 B があるとすれば、このパリンドロームを認識する制限酵素に切断された場合、何個の断片ができますか。

3 個です。

A　　B

・ 各断片に番号を付けましょう。

1　　A　　2　　B　　3

・ 最も大きな断片は何番ですか。

断片 3 です。

・ 最も小さな断片は何番ですか。

断片 2 です。

・ 特定のパリンドロームに対応する切断部位が、それぞれ異なる間隔で 5 ヶ所に存在する DNA 分子を書いてください。それぞれの切断部位を制限酵素で切断した場合、何個の断片ができますか。

答えは生徒ごとに異なります。

・ 各断片に番号を付けてください。

答えは生徒ごとに異なります。

・ 断片を大きい方から順番に並べてください。

答えは生徒ごとに異なります。

A　　B

この図では、A と B は同じ DNA 鎖上の異なるパリンドローム配列です。B 配列を認識する制限酵素のみが存在しています。

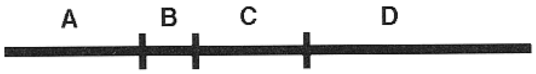
・ 断片が 2 個しかできない理由を説明してください。

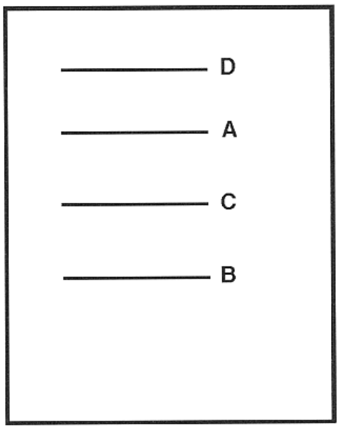
この制限酵素は B 位置のみで切断するので、DNA 断片は 2 個できます。

◆Lesson 2 アガロースゲル電気泳動

＜学習 1＞

あるDNAは、下図のように4種類の断片に切断されます。この4種類の断片の溶液をアガロースゲルのサンプルウェルに入れます。上で述べた電気泳動の原理をふまえて、(右図に)これらの断片がどのように分離するか考えて書き入れてみましょう。





先生の答えと比べてみましょう。

皆さんの予測は正解でしたか?

・ より大きな断片(塩基対数の多い断片)はゲルの上部、下部のどちらにありますか。それはなぜですか。

より大きな断片はゲルの上部にあるでしょう。なぜなら、より大きな断片ほどゲルの中を通って進むのがより困難だからです。

・ 4種類の断片がそれぞれ500個ずつあるとしたら、バンドは何本になるでしょうか？

それでも、バンドは4本しか存在しないでしょう。

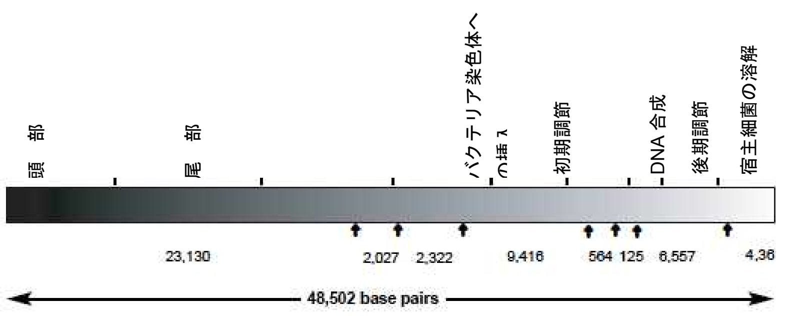
・ それぞれの断片の重さを量ることができるとしたら、一番重いのはどれでしょう？また、それはなぜですか。

一番重いのは断片Dでしょう。なぜなら、断片Dは最大のDNA断片であり、したがって質量も最大のはずだからです。

・ DNA断片がアガロースゲルを通って移動する場合は、この法則に従います。

DNA断片が大きければ大きいほど、アガロースゲル内での移動速度が遅くなります。

Hind III を用いて、切断した DNA 断片図。矢印は切断部位を、数字は各断片の塩基対数を表します。

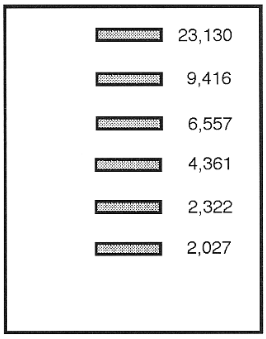


・ 制限酵素 *Hind* III により生じた断片数は何個ですか。

8 個

これらの断片が電気泳動中にどのように分かれるか、予測して右のゲル図にましょう。

・ 各断片に塩基対数を書き加えてください。



＜学習 2　どうやって DNA を見えるようにするか＞

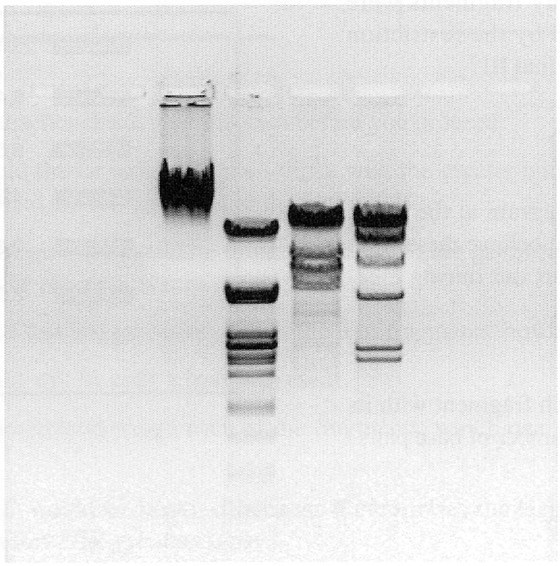
・サンプルローディングダイを加える前の DNA は何色でしたか？

DNA は無色です。

◆Lesson3　データ解析

DNA 電気泳動バンドパターンの複製であるプラスチックフィルムを貼りましょう。

もしあれば、DNA 電気泳動バンドパターンを示す乾燥ゲルを貼りましょう。



データ表。各断片がサンプルウェルから移動した距離を（ミリ単位で）計測し、表に記録します。
Hind III ラダーの位置と比較して、各断片の大きさ（塩基対の数）を推定します。
中には 6 断片よりも少ないレーンもあります。

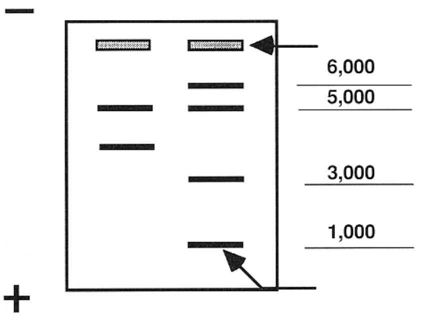
一番大きな断片から書いてください ↓	L ＝ 制限酵素なしー完全なラムダ DNA		P ＝ ラムダ DNA の *Pst* I 切断断片		E ＝ ラムダ DNA の *Eco*R I 切断断片		H ＝ ラムダ DNA の *Hind* III 切断断片	
	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	実際の塩基対数
バンド 1	14	35,000	17.5	9,400	16	23,000	16	23,130bp
バンド 2			23.5	4,500	19	7,000	17	9,416bp
バンド 3			28	3,000	21	5,500	20	6,557 bp
バンド 4			29	2,350	22.5	4,500	23.5	4,361bp
バンド 5			30.5	2,200	25	3,500	29	2,322bp
バンド 6			31	2,000			31	2,027bp

＜DNA 断片の解析＞

・ DNA スタンダードはどちらのレーンですか。 なぜわかりましたか。

右が DNA スタンダードです。なぜなら、既知の DNA 断片を含んでいるからです。

・ 右レーンの各バンドに、それぞれの塩基対の大きさを書き入れてください。



・ 2 本のレーンのバンドを比較してください。左レーンの断片の大きさを推定してください。

上のバンド 5,000

下のバンド 4,000

・左レーンの 2 本のバンドの大きさは、どのようにして決定しましたか。

未知のバンドの移動距離を、標準レーンの既知のバンドの移動距離と比較しました。

実際に電気泳動したゲルを見てみましょう。 （例）

・各バンドがサンプルウェルから移動した**距離をミリ単位で測りましょう**。

サンプルウェルの 1 番下からバンドの下の線までの距離を測ってください。

・データを右の表に書き入れましょう。

・数字はミリ単位で書いてください。

左レーン		右レーン	
1	9	1	6
2	20	2	9
		3	20
		4	29

未知の断片の移動距離もグラフに書き入れています。未知の断片の点から塩基対数（bp）を表す縦軸に直線を引くことで、断片の大きさを決定できます。

・ 断片 2 の塩基対数は何個ですか。

約 4,000 塩基対です。

・ この推定法はどの程度正確ですか。

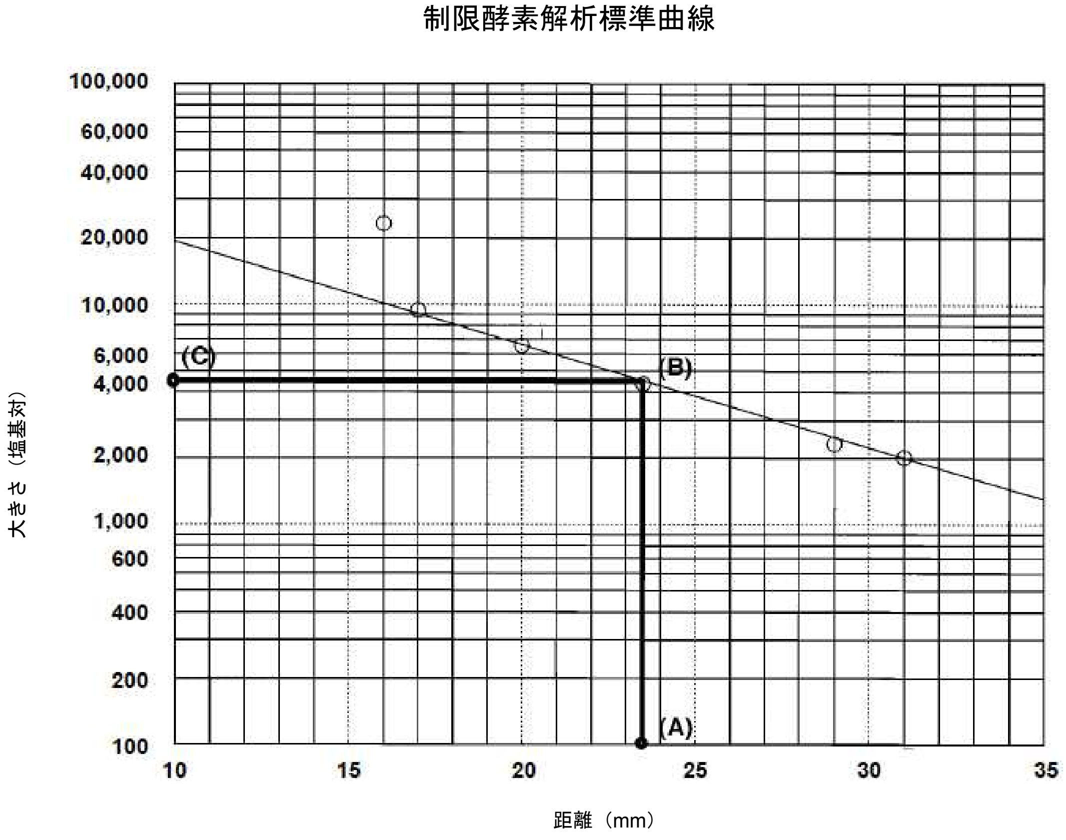
この標準曲線は直線なので、この推定法はほぼ正確です。おそらく、実際値の 10%以内だと思われます。

実験データから、ゲルで分離した各 DNA 断片の大きさの近似値を推定できます。この結果は塩基対数で表されます。

・ この決定法のやりかたを説明してください。

未知の断片を基準レーンのバンドの中で最も近いバンドと比較します。Hind III 標準バンドの大きさがわかっているので、Hind III バンドの位置と比較することで未知のバンドの大きさを推定することができます。

標準曲線見本



例えば、*Pst* I で切断したバンド 2 が 23.5mm（A）移動したとします。X 軸上の 23.5mm の点を記し、その点から標準曲線に向かって線を引きます。その線と標準曲線との交点（B）を円で囲みます。B 点から Y 軸に向かって線を引き、Y 軸との交点を求めます。この点（C）が、この断片の大きさの近似値です。*Pst* I 切断断片 2 の大きさは約 4500 塩基対です。この表の直線部分の範囲内でこの操作を繰り返し、未知の断片の大きさを求めます。

一番大きな断片から書きましょう ↓	L ＝ 制限酵素なし－完全なラムダ DNA		P ＝ ラムダ DNA の *Pst* I 切断断片		E ＝ ラムダ DNA の *Eco*R I 切断断片		H ＝ ラムダ DNA の *Hind* III 切断断片	
	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	塩基対の推定数	距離（mm）	実際の塩基対数
バンド 1	14	(35,000)	17.5	(9,400)	16	(23,000)	16	23,130bp
バンド 2			23.5	4,500 (4,500)	19	7,400 (7,000)	17	9,416bp
バンド 3			28	2,750 (3,000)	21	6,000 (5,500)	20	6,557 bp
バンド 4			29	2,500 (2,350)	22.5	5,000 (4,500)	23.5	4,361bp
バンド 5			30.5	2,200 (2,200)	25	3,800 (3,500)	29	2,322bp
バンド 6			31	2,000 (2,000)			31	2,027bp

（括弧内の値はゲルのバンド比較のデータからの数値です）

- このデータ表の完成後に、本実験で DNA 断片の大きさを決定するために行ったことを簡単に説明してください。

大きさを決定する第 1 の方法では、既知の DNA サンプルがアガロースゲル内を移動した距離と比較することにより、未知の DNA バンドの大きさの近似値を求めました。第 2 の方法では、既知の DNA バンドを基準にした標準曲線を作り、その標準曲線を利用して未知のサンプルの大きさを決定しました。第 2 の方法のほうがより正確に DNA の大きさを決定します。

- さらに正確に DNA の大きさを推定する方法を考え、説明してください。

標準曲線を（1 本ではなく）2 本書けば、さらに正確に大きさを推定できるでしょう。1 本目の標準曲線は大きめの数値（バンド 1、2、および 3）に対応させて引き、2 本目の標準曲線は小さめの数値（バンド 4、5、および 6）に対応させます。その後、最も適切な曲線から未知の断片の大きさを推定できます。

- 断片の大きさ（塩基対数）を決定する 2 種類の方法（直接ゲル計測および片対数グラフ）を比較しなさい。どちらの方法がより正確だと思いますか。理由を説明してください。

いずれの方法にも長所と短所があります。ゲル計測法では、ゲル全体の範囲内から大きさを推定することができます。特に、極端に大きな断片でも大きさを推定できます。大きな断片は標準曲線の直線部分の外側にあるので、大きな断片の大きさを標準曲線から正確に推定することはできません。しかし、ゲルからなら大きな断片の大きさを推定できます。

片対数グラフの標準曲線は、その直線部分の範囲内でなら非常に正確です。片対数グラフの対数サイクルを使用すれば、Eco RI レーンのバンド 3 のような、標準バンド同士の間にある断片の大きさを正確に推定できます。このような中間の大きさを、ゲルから直接推定することは困難です。

バイオ･ラッド ラボラトリーズ株式会社

本社　〒116-0014 東京都品川区東品川 2-2-24

Tel : 03-6361-7000　Fax : 03-5463-8480

大阪　〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11

Tel : 06-6308-6568　Fax : 06-6308-3064

福岡　〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28

Tel : 092-475-4856　Fax : 092-475-4858

製品の学術的なお問い合わせ

修理･メンテナンスに関するお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331　Fax : 03-6404-0334

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

http://explorer.bio-rad.co.jp

M4121 1303E